

Cokelat dan produk-produk cokelat



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	2
5 Klasifikasi.....	2
6 Syarat mutu	2
7 Pengambilan contoh	5
8 Cara uji	5
9 Syarat lulus uji	5
10 Higiene.....	5
11 Pengemasan.....	5
12 Syarat penandaan	5
Lampiran A (normatif) Cara uji coklat dan produk-produk coklat.....	6
Tabel 1 – Syarat mutu coklat dan produk-produk coklat	3

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Cokelat dan produk-produk cokelat* ini merupakan SNI baru. Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam persyaratan mutu dan cara uji;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri olahan kakao.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian;
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 18 Tahun 2012 tentang Pangan;
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen;
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan;
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan;
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan;
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang Pada Kemasan Pangan Dari Plastik.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*);
9. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033/MENKES/PER/VII/2012, tentang Bahan Tambahan Pangan;
10. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan;
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 00.06.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04, Makanan dan Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 6 Desember 2012 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Mei 2013 sampai dengan tanggal 23 Agustus 2013 dengan hasil akhir RASNI.

Cokelat dan produk-produk cokelat

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, klasifikasi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji cokelat dan produk-produk cokelat.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

CODEX STAN 87-1981, REV.1-2003, *Codex Standard for Chocolate and Chocolate Products*.

SNI ISO 6887-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1: Aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran desimal*.

SNI ISO 6887-4:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4: Aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging, dan ikan serta produk perikanan*.

SNI ISO 7218:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan- Persyaratan umum dan pedoman untuk pengujian mikrobiologi*.

SNI ISO 7251:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan- Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Escherichia coli terduga – Teknik angka paling mungkin (APM)*.

SNI ISO 21527-2: 2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan- Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 1 : Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air kurang dari atau sama dengan 0,95*.

3 Istilah dan definisi

3.1

cokelat

produk homogen yang dihasilkan melalui proses pencampuran produk kakao (kakao massa dan atau lemak kakao dan atau kakao bubuk) dengan atau tanpa penambahan susu, gula, dan atau bahan tambahan pangan yang diizinkan

3.2

produk-produk cokelat

cokelat dengan tambahan bahan pangan dan/atau produk pangan lain; kecuali bahan baku tepung, pati, dan lemak hewan selain lemak susu

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Kakao massa dan atau lemak kakao dan atau kakao bubuk.

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk digunakan. Total bahan dan/atau produk pangan lain tersebut dapat ditambahkan maksimal 40 % dari berat produk akhir.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Klasifikasi

Cokelat diklasifikasikan sebagai berikut:

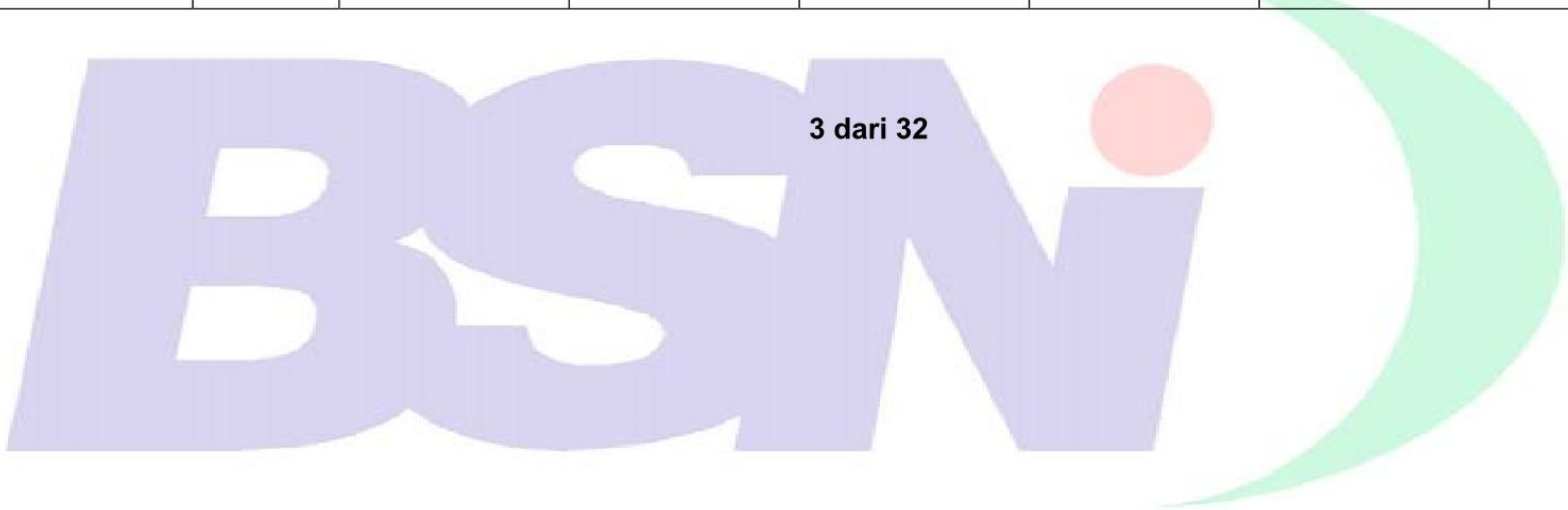
- a) Cokelat hitam (*dark chocolate, semisweet chocolate, bittersweet chocolate*);
Cokelat hitam, diperhitungkan dalam kondisi tanpa kandungan air, mengandung tidak kurang dari 35 % padatan kakao, tidak kurang dari 18 % lemak kakao, dan tidak kurang dari 14 % padatan kakao tanpa lemak.
- b) Cokelat hitam manis (*sweet chocolate*);
Cokelat hitam manis, diperhitungkan dalam kondisi tanpa kandungan air, mengandung tidak kurang dari 30 % padatan kakao, tidak kurang dari 18 % lemak kakao, dan tidak kurang dari 12 % padatan kakao tanpa lemak.
- c) Cokelat hitam kovertur (*dark chocolate couverture*);
Cokelat hitam kovertur, diperhitungkan dalam kondisi tanpa kandungan air, mengandung tidak kurang dari 35% padatan kakao, tidak kurang dari 31% lemak kakao, dan tidak kurang dari 2,5% padatan kakao tanpa lemak.
- d) Cokelat susu (*milk chocolate*);
Cokelat susu, diperhitungkan dalam kondisi tanpa kandungan air, mengandung tidak kurang dari 25 % padatan kakao, tidak kurang dari 15 % lemak kakao, tidak kurang dari 2,5 % padatan kakao tanpa lemak, dan tidak kurang dari 12 % padatan susu.
- e) Cokelat susu kovertur (*milk chocolate couverture*);
Cokelat susu kovertur, diperhitungkan dalam kondisi tanpa kandungan air, semestinya mengandung tidak kurang dari 25 % padatan kakao, tidak kurang dari 15 % lemak kakao, tidak kurang dari 2,5 % padatan kakao tanpa lemak, tidak kurang dari 12% padatan susu, dan tidak kurang dari 31% total lemak.
- f) Cokelat putih (*white chocolate*);
Cokelat putih, diperhitungkan dalam kondisi tanpa kandungan air, semestinya mengandung tidak kurang dari 20% lemak kakao, dan tidak kurang dari 14% padatan susu.
- g) Cokelat putih kovertur (*white chocolate couverture*).
Cokelat putih kovertur, diperhitungkan dalam kondisi tanpa kandungan air, semestinya mengandung tidak kurang dari 20% lemak kakao, tidak kurang dari 14% padatan susu dan tidak kurang dari 25% total lemak.

6 Syarat mutu

Syarat mutu cokelat sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu coklat dan produk-produk coklat

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan						
			Cokelat hitam*)	Cokelat hitam manis*)	Cokelat hitam kovertur*)	Cokelat susu*)	Cokelat susu kovertur*)	Cokelat putih*)	Cokelat putih kovertur*)
1	Keadaan								
1.1	Bau	-	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal
1.2	Rasa	-	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal
1.3	Warna	-	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal	khas, normal
2	Lemak kakao**), b/b	%	≥ 18	≥ 18	≥ 31	≥ 15	≥ 15	≥ 20	≥ 20
3	Padatan kakao tanpa lemak**), b/b	%	≥ 14	≥ 12	≥ 2,5	≥ 2,5	≥ 2,5	-	-
4	Total padatan kakao**) b/b	%	≥ 35	≥ 30	≥ 35	≥ 25	≥ 25	-	-
5	Total padatan susu**) b/b	%	-	-	-	≥ 12	≥ 12	≥ 14	≥ 14
6	Total lemak, b/b	%	-	-	-	-	≥ 31	-	≥ 25
7	Cemaran logam								
7.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1
7.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,5	maks. 0,5	maks. 0,5	maks. 0,5	maks. 0,5	maks. 0,5	maks. 0,5
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0	maks. 40,0	maks. 40,0	maks. 40,0	maks. 40,0	maks. 40,0	maks. 40,0
7.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03	maks. 0,03



Tabel 1 - (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan						
			Cokelat hitam*)	Cokelat hitam manis*)	Cokelat hitam kovertur*)	Cokelat susu*)	Cokelat susu kovertur*)	Cokelat putih*)	Cokelat putih kovertur*)
8	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1	maks. 1
9	Cemaran mikroba								
9.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1 x 10 ⁴	maks. 1 x 10 ⁴	maks. 1 x 10 ⁴	maks. 1 x 10 ⁴	maks. 1 x 10 ⁴	maks. 1 x 10 ⁴	maks. 1 x 10 ⁴
9.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
9.3	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif/25 g	negatif/25 g	negatif/25 g	negatif/25 g	negatif/25 g	negatif/25 g	negatif/25 g
9.4	Kapang dan khamir	koloni/g	maks.1 x 10 ²	maks.1 x 10 ²	maks.1 x 10 ²	maks.1 x 10 ²	maks.1 x 10 ²	maks.1 x 10 ²	maks.1 x 10 ²
CATATAN: *) semua nama disesuaikan dengan klasifikasi **) diperhitungkan atas dasar berat kering dalam produk jika tidak dapat dilakukan dengan metode uji									



7 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

8 Cara uji

Cara uji untuk cokelat seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji total lemak sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji cemaran logam
 - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.4.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.4.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.4.3
- e) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.6
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.6.1, SNI ISO 6887-1:2012 dan SNI ISO 6887-4:2012
 - Cara uji Angka Lempeng Total sesuai Lampiran A.6.2
 - Cara uji E. coli sesuai dengan SNI ISO 7251:2012
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.6.3
 - Cara uji Kapang & khamir sesuai dengan SNI ISO 21527-2: 2012,
- g) Untuk pengujian butir 2, butir 3, butir 4 dan butir 5 dari Tabel Syarat mutu, dilakukan dengan cara perhitungan (secara teoritis) sesuai dengan Lampiran A.7

9 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

10 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

11 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

12 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji coklat dan produk-produk coklat

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh coklat dan produk-produk coklat dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh coklat dan produk-produk coklat dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh coklat dan produk-produk coklat dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "khas, normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "khas, normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati warna contoh uji; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "khas, normal"; dan
- b) jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Total lemak

A.3.1 Prinsip

Ekstrak minyak bebas dari contoh dengan menggunakan pelarut organik non polar, sebelumnya dilakukan hidrolisis

A.3.2 Peralatan

- a) Neraca analitis terkalibrasi dengan ketelitian 0,000 1 g;
- b) Labu didih dasar rata dengan kapasitas 250 mL;
- c) Oven listrik terkalibrasi;
- d) Pemanas listrik
- e) Kaca arloji;
- f) Alat ekstraksi Soxhlet lengkap; dan
- g) Timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring.

A.3.3 Pereaksi

- a) Asam Klorida (HCl) 25%;
- b) Heksana; dan
- c) Larutan perak nitrat (AgNO_3) 0,1N.

A.3.4 Cara kerja hidrolisa

- Timbang 9 sampai dengan 10 g contoh dengan ketelitian mendekati 0,0001 g ke dalam gelas piala;
- Tambahkan 45 mL air suling mendidih, 55 mL HCl 25% dan beberapa butir batu didih;
- Bilas kaca arloji dengan 100 mL air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- Saring endapan melalui kertas saring yang bebas lemak. Bilas gelas piala tiga kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas khlor yang dapat ditentukan dengan menambahkan 1 sampai dengan 3 tetes AgNO_3 terhadap filtrat, jika tidak terdapat endapan putih (AgCl) maka telah bebas khlor; dan
- Pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring yang bebas lemak dan keringkan selama 6 sampai dengan 18 jam pada suhu 100 sampai dengan 101 °C.

A.3.5 Ekstraksi lemak

- Keringkan selama satu jam labu didih yang berisi beberapa butir batu didih;
- Dinginkan dan timbanglah dengan ketelitian mendekati 0,0001 g, sambungkan dengan alat ekstraksi Soxhlet;
- Masukkan timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam Soxhlet kemudian tuangkan pelarut heksana kurang dari 2/3 kapasitas labu didih;
- Ekstrak selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi kira-kira 3 tetes per detik;
- Setelah ekstraksi selesai, keluarkan timbal ekstraksi atau selongsong kertas saring lalu uapkan pelarut heksana dengan alat penguapan atau dapat dihilangkan dengan memanaskan labu di atas penangas air; dan
- Keringkan labu didih beserta lemak didalam oven pada suhu 100 °C; dinginkan dan timbang. Ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05%.

A.3.6 Perhitungan

$$\text{Total lemak (\% b/b, bk)} = \frac{(W_2 - W_1)100}{W_0} \times \frac{100}{100 - K_a}$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot contoh (g)

W_1 adalah bobot labu dan lemak setelah pengeringan (g)

W_2 adalah bobot labu kosong (g)

K_a adalah kadar air (%)

A.4 Cemarkan logam

A.4.1 Kadmium (Cd) dan Timbal (Pb)

A.4.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.4.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi retensi partikel 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.4.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- b) Asam klorida, HCl pekat;
- c) Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- f) Larutan baku 200 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.
- g) Larutan baku 20 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.
- i) Larutan baku 1 000 µg/mL Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.
- j) Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.

- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

A.4.1.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh uji (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, kemudian larutkan dengan 10 mL HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

A.4.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.1.6 Ketelitian

Kisaran *Relative Standard Deviation* (RSD) dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 % maka uji harus diulang kembali.

A.4.2 Timah (Sn)

A.4.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.4.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

A.4.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, KCl 10 mg/mL; larutkan 1 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Sn; dan larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn.

A.4.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO_3 pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl , dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;

- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $N_2O-C_2H_2$;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.4.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$)

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.2.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 % maka uji harus diulang kembali.

A.4.3 Merkuri (Hg)

A.4.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.4.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) *Microwave digester*;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) Tabung destruksi;
- g) Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Gelas ukur 25 mL;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- k) Gelas piala 500 mL.

A.4.3.3 Bahan dan Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- b) Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- c) Campuran asam nitrat : asam hidroksi perklorat ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 1:1$);
- d) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- e) Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 %;
- f) Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- h) Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0 025 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.
- l) Batu didih.

A.4.3.4 Cara kerja

A.4.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;

- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.4.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 10 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.4.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.4.3.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 % maka uji harus diulang kembali.

A.5 Cemaran arsen (As)

A.5.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.5.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Bunsen Burner*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu berbahan borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 200 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas ukur 25 mL.

A.5.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- l) Larutan baku 100 µg/mL As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 µg/mL As.
- m) Larutan baku 1 µg/mL As; dan
pipet 1 mL larutan baku As 100 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 µg/mL As.
- n) Larutan baku kerja As.
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 µg/mL As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL dan 0,05 µg/mL As.

A.5.4 Cara kerja

A.5.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO₃ pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H₂SO₄ pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO₃ pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO₄ 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangkan setelah penambahan HClO₄, tambahkan lagi sedikit HNO₃ pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H₂O dan 5 mL (NH₄)₂C₂O₄ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO₃ di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH₄) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.5.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan Mg(NO₃)₂, Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu (450 °C) (± 1 jam);

- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0.1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan Bunsen *burner* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.5.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 % maka uji harus diulang kembali.

A.6 Cemarkan mikroba

A.6.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka lempeng total

A.6.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.6.1.2 Peralatan

- a) Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- b) Otoklaf;
- c) Neraca analitik kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- d) Pemanas listrik;
- e) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- f) Gelas piala steril;
- g) Erlenmeyer steril;
- h) Botol pengencer steril;
- i) Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;

- j) Tabung reaksi; dan
- k) Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.6.1.3 Larutan pengencer untuk angka lempeng total

Buffered peptone water (BPW)

- | | |
|----------------------------|-------|
| - Peptone | 10 g |
| - Natrium klorida | 5 g |
| - Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| - Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g |
| - Air suling | 1 L |

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.6.1.4 Homogenisasi contoh untuk angka lempeng total

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.6.2 Angka lempeng total

A.6.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.6.2.2 Peralatan

- a) Inkubator $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- g) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

A.6.2.3 Pembenihan dan pengencer

a) *Buffered peptone water (BPW)*

- | | |
|----------------------------|-------|
| - Peptone | 10 g |
| - Natrium klorida | 5 g |
| - Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| - Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g |
| - Air suling | 1 L |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b) *Plate count agar (PCA)*

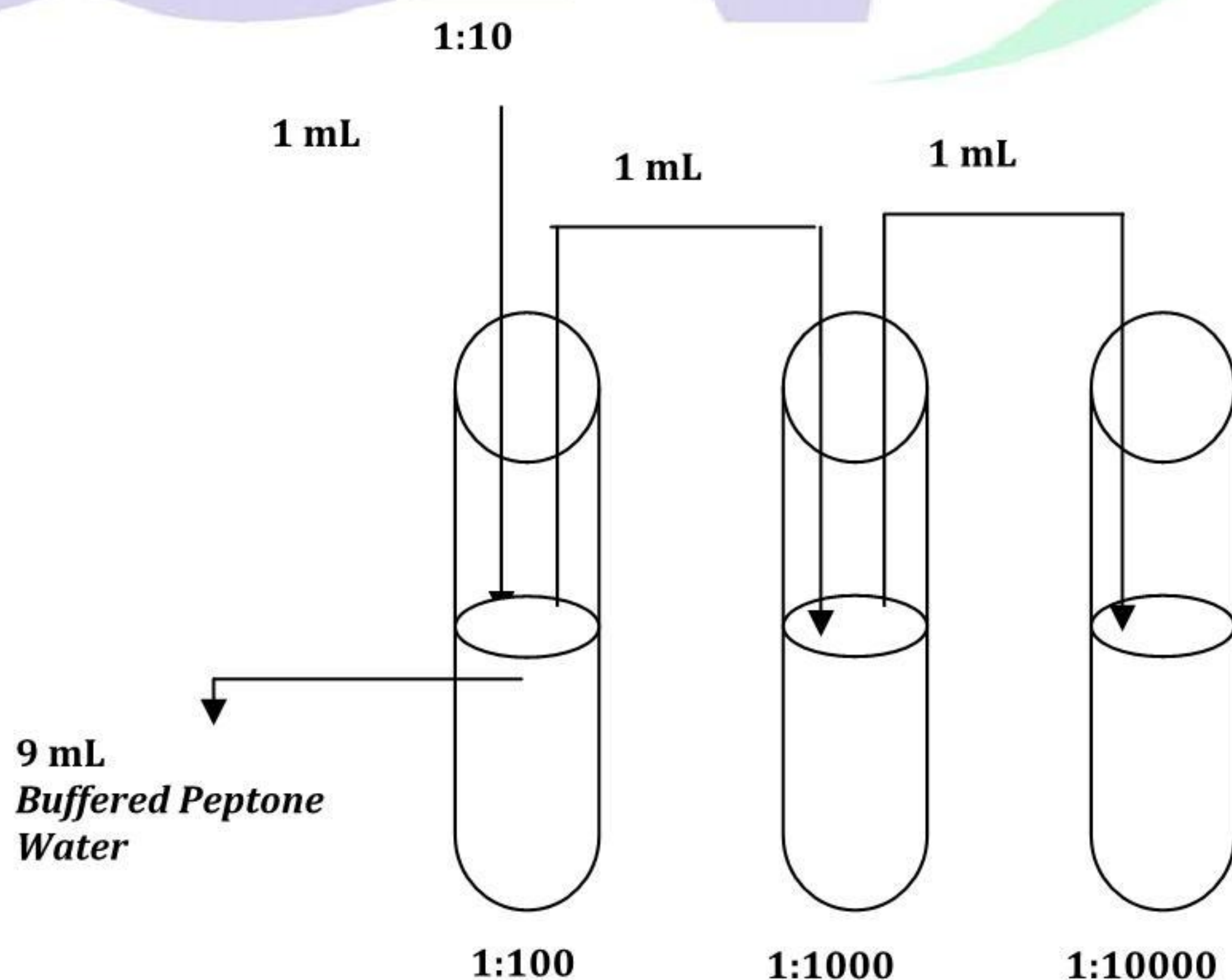
- | | |
|-----------------|-------|
| - Yeast extract | 2,5 g |
|-----------------|-------|

- *Pancreatic digest of caseine* 5 g
- Glukosa 1 g
- Agar 15 sampai dengan 20 g
- Air suling 1 L

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

A.6.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.
- b) Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran 10^1 - 10^5 ke dalam cawan Petri steril secara duplo.
- c) Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu (45 ± 1) °C dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- d) Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- e) Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- f) Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
- g) Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram dan inkubasikan pada suhu 30 °C selama 72 jam.
- h) Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam.
- i) Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengence *Buffered Peptone Water* (BPW).

A.6.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

n adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.6.2.6 Pernyataan hasil

A.6.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;

n_1 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 k
 e) oloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
 – jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\ 000 \times 640 = 640\ 000\ (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
 area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\ 500\ 000\ (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\ 900\ 000\ (5.9 \times 10^6)$

- f) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
 g) menghitung koloni yang merambat.
 Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
 – perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
 – perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembedahan; dan
 – perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembedahan.
 Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni; dan
 h) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan Petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah (<10).

A.6.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
 contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
 b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
 contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
 c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
 – bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
 contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 – bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
 contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.6.3 *Salmonella* sp.

A.6.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.6.3.2 Peralatan

- a) Inkubator (37 ± 1) °C;
- b) Otoklaf;
- c) Oven;
- d) Neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- e) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- f) Penangas air, (44 sampai dengan 47) °C;
- g) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ($41,5 \pm 1$) °C;
- h) Penangas air bersuhu (37 ± 1) °C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, *Erlenmeyer* 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.6.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Buffered peptone water* (BPW);
- b) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RVS) (media RVS harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut). Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- c) *Muller – Kauffmann Tetrathionate / novobiocin* (MKTTn) *broth*;
- d) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar;
- e) *Hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *Bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *Triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) Urea agar;
- i) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- j) Larutan *physiological saline*, 0,85% (steril);
- k) Toluene;
- l) Kertas cakram β - galaktosidase;
- m) Media Voges-Proskauer (VP);
- n) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- o) Larutan *creatine*;
- p) 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol;
- q) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40%;

- r) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- s) Pereaksi *Kovacs*;
- t) *Semi-solid Nutrient Agar* (NA);
- u) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- v) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent flagellar* (H) *antiserum*; dan
- w) *Salmonella anti-Vi* sera.

A.6.3.4 Cara Kerja

A.6.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL BPW steril. Kocok selama 2 menit;
- b) inkubasikan pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (18 ± 2) jam.

A.6.3.4.2 Pengkayaan

- a) Pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media *RVS* dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *MKTTn broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan
- b) inkubasikan media *RVS* pada suhu $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam dalam penangas air bersirkulasi dan *MKTTn broth* pada $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam.

A.6.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan *TT broth* ke dalam cawan Petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan *RV*;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
 XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.
 Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
- HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.
 Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
- BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.
 Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;

A.6.3.4.4 Uji penegasan

A.6.3.4.4.1 Seleksi koloni untuk uji penegasan

- Ambil sedikitnya 1 koloni tipikal pada masing-masing cawan yang berisi media XLD, HE, dan BS, ambil kembali sedikitnya 4 koloni bila koloni pertama tidak tipikal;
- goreskan masing-masing koloni tersebut pada cawan yang berisi NA yang akan ditumbuhi oleh koloni yang terisolasi dengan baik, kemudian inkubasikan pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam;
- gunakan kultur murni untuk uji penegasan biokimia dan serologi selanjutnya.

A.6.3.4.4.2 Uji penegasan biokimia

- Dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak;
- inkubasi agar miring TSI pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam. Pada TSI, perubahan yang terjadi pada medium adalah sebagai berikut:

- bagian tegak:	
kuning	glukosa positif
merah atau tak berubah warna	glukosa negatif
hitam	pembentukan H_2S
gelembung atau retak	pembentukan gas dari glukosa
- permukaan agar miring:	
kuning	laktosa dan/atau sukrosa positif
merah atau tak berubah warna	laktosa dan sukrosa negatif

90% kasus tipikal *Salmonella* positif membentuk gelembung gas dan H_2S (warna hitam);
- dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni pada A.6.3.4.4.1.c dan inokulasikan ke dalam media Urea agar dengan cara menggores agar miring;
- inkubasikan agar miring urea pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam, dan amati setiap interval waktu tertentu. Pada Urea agar, reaksi positif ditunjukkan dengan reaksi pemecahan urea yang menghasilkan ammonia akan menunjukkan perubahan warna *phenol red* menjadi merah mawar hingga merah muda dan kemudian akan semakin pekat. Reaksi akan muncul setelah 2 jam sampai dengan 4 jam;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.6.3.4.4.1 ke dalam media LDB, kemudian inkubasikan pada $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam, reaksi positif *Salmonella* sp. pada LDB ditandai dengan terbentuknya kekeruhan dan warna ungu setelah inkubasi. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.6.3.4.4.1 ke dalam tabung yang berisi 0,25 mL larutan *physiological saline* steril;
- tambahkan 1 tetes toluene dan kocok tabung. Tempatkan tabung pada penangas air bersuhu $37 ^\circ\text{C}$ dan diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan sebanyak 1 lembar kertas cakram β -galaktosidase dan kocok;
- inkubasikan tabung pada penangas air $37 ^\circ\text{C}$ dan diamkan selama (24 ± 3) jam, amati tabung pada interval waktu tertentu. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Reaksi muncul setelah 20 menit;
- dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.6.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi 3 mL media VP, kemudian inkubasikan pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam;
- setelah inkubasi tambahkan dua tetes larutan *creatine*, tiga tetes larutan 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol, dan dua tetes larutan KOH 40%, kemudian kocok setelah penambahan tiap pereaksi tersebut. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah terang setelah 15 menit;

- k) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni pada A.6.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi media TB, kemudian inkubasikan pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam; dan
- l) setelah inkubasi tambahkan 1 mL pereaksi Kovacs. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin yang berwarna merah, sedangkan pembentukan cincin berwarna kuning menunjukkan reaksi negatif.

A.6.3.4.4.3 Interpretasi hasil uji biokimia

Interpretasi hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel A.1

Tabel A.1 – Interpretasi hasil uji biokimia

Uji biokimia	Galur <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi</i> A		<i>S. paratyphi</i> B		<i>S. paratyphi</i> C		Galur lain	
	Reaksi	% ^a	Reaksi	% ^a	Reaksi	% ^b	Reaksi	% ^b	Reaksi	% ^a
TSI asam dari glukosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI gas dari glukosa	- ^c	0	+	100	+		+		+	92
TSI asam dari laktosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI asam dari sukrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI produksi H ₂ S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrolisis urea	-	0	-	0	-		-		-	1
<i>Lysine decarboxylation</i>	+	98	-	0	+		+		+	95
Reaksi β -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 ^d
Reaksi Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Produksi indol	-	0	-	0	-		-		-	1

CATATAN:

^a Persentase mengindikasikan bahwa tidak semua serotipe *Salmonella* menunjukkan reaksi yang ditunjukkan dengan + atau -. Persentase dapat bervariasi antar serotipe dan dalam serotipe dari *food poisoning serotype* dari lokasi yang berbeda

^b Persentase tidak diketahui dari literatur

^c *Salmonella Typhi* bersifat anaerogenik

^d *Salmonella enterica* spp. *arizonae* memberikan reaksi laktosa positif atau negatif namun selalu menunjukkan reaksi positif pada β -galactosidase.

A.6.3.4.4.4 Uji penegasan serologi dan serotyping

Deteksi keberadaan antigen O-, Vi-, dan H- *Salmonella* diuji dengan aglutinasi (penggumpalan) dengan sera yang sesuai, dari kultur murni yang diperoleh pada A.6.4.4.4.1.c dan setelah galur auto-aglutinasi dihilangkan.

A.6.3.4.4.4.1 Penghilangan galur auto-aglutinasi

- Tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85% pada gelas objek yang bersih;
- suspensikan sebanyak 1 Ose penuh biakan dari A.6.3.4.4.1 sampai terbentuk suspensi yang homogen dan keruh;
- goyangkan gelas objek selama 30 sampai dengan 60 detik dan amati gelas objek, bila bakteri mengelompok menjadi unit-unit terpisah maka galur tersebut termasuk auto-aglutinasi, dan tidak dilanjutkan untuk pengujian tahap selanjutnya.

A.6.3.4.4.4.2 Uji antigen O-

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum O- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* O- menunjukkan hasil sebagai berikut:
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.6.3.4.4.4.3 Uji antiserum Vi-

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum Vi- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* Vi- menunjukkan hasil sebagai berikut:
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.6.3.4.4.4.4 Uji antigen H-

- Inokulasikan media NA semi solid dengan koloni murni yang bukan merupakan galur auto-aglutinasi;

- b) inkubasikan media pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 3) jam;
- c) dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- d) emulsikan biakan pada NA semi solid setelah inkubasi dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose;
- e) tambahkan 1 tetes suspensi biakan tersebut di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- f) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum H- ke dalam bagian yang lain;
- g) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- h) klasifikasi uji *antiserum* H- menunjukkan hasil sebagai berikut:
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *salin*.

A.6.3.4.4.5 Interpretasi hasil uji penegasan

Interpretasi hasil uji serologi yang merupakan uji penegasan dapat dilihat pada Tabel A.2.

Tabel A.2 – Interpretasi hasil uji penegasan

Reaksi biokimia	Auto-aglutinasi	Reaksi serologi	Interpretasi
Tipikal	Tidak	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Galur dipertimbangkan sebagai <i>Salmonella</i>
Tipikal	Tidak	Semua reaksi negatif	Kemungkinan adalah <i>Salmonella</i>
Tipikal	Ya	Tidak diuji	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Bukan <i>Salmonella</i>
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Semua reaksi negatif	

A.6.3.4.5 Pernyataan Hasil

Berdasarkan hasil interpretasi dapat menunjukkan keberadaan *Salmonella* pada contoh uji per 25 gram.

A.7 Perhitungan parameter-parameter mutu coklat

Perhitungan-perhitungan berikut digunakan untuk keperluan menghitung parameter syarat mutu coklat butir 2, 3, 4, dan 5 dari "Tabel 1". Perhitungan didasarkan pada berat kering produk. Pada produk-produk coklat, perhitungan digunakan untuk bagian coklatnya saja, tidak memperhitungkan bahan dan/atau produk pangan yang ditambahkan.

A.7.1 Lemak kakao total (*total cocoa butter*)

A.7.1.1 Prinsip

Lemak kakao di dalam coklat didapatkan dari produk-produk kakao yang digunakan di dalam pembuatan coklat; yaitu kakao massa, kakao bubuk, dan lemak kakao itu sendiri.

A.7.1.2 Perhitungan

Lemak kakao total (% b/b, bk)

$$= \frac{((f_{CM} \times CM) + (f_{CP} \times CP) + (CB - (ka_{CB} \times CB)))}{(S - (ka_S \times S)) + (CB - (ka_{CB} \times CB)) + (CM - (ka_{CM} \times CM)) + (MP - (ka_{MP} \times MP)) + (CP - (ka_{CP} \times CP)) + (MF - (ka_{MF} \times MF))} \times 100\%$$

Keterangan:

- f_{CM} adalah kadar lemak dari kakao massa yang digunakan (%)
 CM adalah kadar kakao massa dalam formula cokelat (%)
 f_{CP} adalah kadar lemak dari kakao bubuk yang digunakan (%)
 CP adalah kadar kakao bubuk dalam formula cokelat (%)
 CB adalah kadar lemak kakao dalam formula cokelat (%)
 ka_{CB} adalah kadar air dari lemak kakao yang digunakan (%)
 S adalah kadar gula dalam formula cokelat (%)
 ka_S adalah kadar air dari gula yang digunakan (%)
 ka_{CM} adalah kadar air dari kakao massa yang digunakan (%)
 MP adalah kadar susu bubuk dalam formula cokelat (%), dapat lebih dari 1 tipe
 ka_{MP} adalah kadar air dari susu bubuk yang digunakan (%), disesuaikan dengan tipenya
 ka_{CP} adalah kadar air dari kakao bubuk yang digunakan (%)
 MF adalah kadar lemak susu yang digunakan (ditambahkan) dalam formula cokelat (%)
 ka_{MF} adalah kadar air dari lemak susu digunakan (ditambahkan) (%)

Contoh :

Material	Contoh kadar air	Contoh kadar lemak	Contoh formula
Gula	0,2 %	0 %	40 %
Lemak kakao	0,1 %	99,9 %	21 %
Kakao massa	3,0 %	53,0 %	19 %
Susu bubuk berlemak	4,0 %	26,0 %	10 %
Susu bubuk bebas lemak	3,8 %	1,0 %	3 %
Kakao bubuk	3,5 %	11,0 %	5 %
Lemak susu	0,5 %	99,9 %	2 %

Lemak kakao total (% b/b, bk)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{((53 \times 19) + (11 \times 5) + (21 - (0,1 \times 21)))}{(40 - (0,2 \times 40)) + (21 - (0,1 \times 21)) + (19 - (3 \times 19)) + (10 - (4 \times 10)) + (3 - (3,8 \times 3)) + (5 - (3,5 \times 5)) + (2 - (0,5 \times 2))} \times 100\% \\
 &= \frac{31,599}{98,63} \times 100\% \\
 &= 32,038\%
 \end{aligned}$$

A.7.2 Padatan kakao total (*total cocoa solids*)

A.7.2.1 Prinsip

Yang dimaksud dengan padatan kakao di dalam cokelat adalah produk-produk kakao yang digunakan di dalam pembuatan cokelat; yaitu kakao massa, kakao bubuk, dan lemak kakao.

A.7.2.2 Perhitungan

Padatan kakao total (% b/b, bk)

$$= \frac{((CM - (ka_{CM} \times CM)) + (CP - (ka_{CP} \times CB) + (CB - (ka_{CB} \times CB)))}{(S - (ka_S \times S)) + (CB - (ka_{CB} \times CB)) + (CM - (ka_{CM} \times CM)) + (MP - (ka_{MP} \times MP)) + (CP - (ka_{CP} \times CP)) + (MF - (ka_{MF} \times MF))} \times 100\%$$

Keterangan:

CM	adalah kadar kakao massa dalam formula cokelat (%)
ka _{CM}	adalah kadar air dari kakao massa yang digunakan (%)
CP	adalah kadar kakao bubuk dalam formula cokelat (%)
ka _{CP}	adalah kadar air dari kakao bubuk yang digunakan (%)
CB	adalah kadar lemak kakao dalam formula cokelat (%)
ka _{CB}	adalah kadar air dari lemak kakao yang digunakan (%)
S	adalah kadar gula dalam formula cokelat (%)
ka _S	adalah kadar air dari gula yang digunakan (%)
MP	adalah kadar susu bubuk dalam formula cokelat (%), dapat lebih dari 1 tipe
ka _{MP}	adalah kadar air dari susu bubuk yang digunakan (%), disesuaikan dengan tipenya
MF	adalah kadar lemak susu yang digunakan (ditambahkan) dalam formula cokelat (%)
ka _{MF}	adalah kadar air dari lemak susu digunakan (ditambahkan) (%)

Contoh :

Material	Contoh kadar air	Contoh kadar lemak	Contoh formula
Gula	0,2 %	0 %	40 %
Lemak kakao	0,1 %	99,9 %	21 %
Kakao massa	3,0 %	53,0 %	19 %
Susu bubuk berlemak	4,0 %	26,0 %	10 %
Susu bubuk bebas lemak	3,8 %	1,0 %	3 %
Kakaobubuk	3,5 %	11,0 %	5 %
Lemaksusu	0,5 %	99,9 %	2 %

Padatan kakao total (% b/b, bk)

$$= \frac{((19 - (3 \times 3)) + (5 - (3,5 \times 5)) + (21 - (0,1 \times 21)))}{(40 - (0,2 \times 40)) + (21 - (0,1 \times 21)) + (19 - (3 \times 3)) + (10 - (4 \times 4)) + (3 - (3,8 \times 3)) + (5 - (3,5 \times 5)) + (2 - (0,5 \times 2))} \times 100\%$$

$$= \frac{44,234}{98,63} \times 100\%$$

$$= 44,848 \%$$

A.7.3 Padatan kakao tanpa lemak total (*total fat-free cocoa solids*)

A.7.3.1 Prinsip

Yang dimaksud dengan padatan kakao tanpa lemak di dalam cokelat adalah bagian yang bukan lemak dari produk-produk kakao yang digunakan di dalam pembuatan cokelat, dalam hal ini diperoleh dari kakao massa dan kakao bubuk.

A.7.3.2 Perhitungan

Padatan kakao tanpa lemak total (% b/b, bk)

$$= \frac{((CM - (f_{CM} \times CM) - (ka_{CM} \times CM)) + (CP - (f_{CP} \times CP) - (ka_{CP} \times CP)))}{(S - (ka_S \times S)) + (CB - (ka_{CB} \times CB)) + (CM - (ka_{CM} \times CM)) + (MP - (ka_{MP} \times MP)) + (CP - (ka_{CP} \times CP)) + (MF - (ka_{MF} \times MF))} \times 100\%$$

Keterangan:

CM	adalah kadar kakao massa dalam formula cokelat (%)
f_{CM}	adalah kadar lemak dari kakao massa yang digunakan (%)
ka_{CM}	adalah kadar air dari kakao massa yang digunakan (%)
CP	adalah kadar kakao bubuk dalam formula cokelat (%)
f_{CP}	adalah kadar lemak dari kakao bubuk yang digunakan (%)
ka_{CP}	adalah kadar air dari kakao bubuk yang digunakan (%)
S	adalah kadar gula dalam formula cokelat (%)
ka_S	adalah kadar air dari gula yang digunakan (%)
CB	adalah kadar lemak kakao dalam formula cokelat (%)
ka_{CB}	adalah kadar air dari lemak kakao yang digunakan (%)
MP	adalah kadar susu bubuk dalam formula cokelat (%), dapat lebih dari 1 tipe
ka_{MP}	adalah kadar air dari susu bubuk yang digunakan (%), disesuaikan dengan tipenya
MF	adalah kadar lemak susu yang digunakan (ditambahkan) dalam formula cokelat (%)
ka_{MF}	adalah kadar air dari lemak susu digunakan (ditambahkan) (%)

Contoh :

Material	Contoh kadar air	Contoh kadar lemak	Contoh formula
Gula	0,2 %	0 %	40 %
Lemak kakao	0,1 %	99,9 %	21 %
Kakao massa	3,0 %	53,0 %	19 %
Susu bubuk berlemak	4,0 %	26,0 %	10 %
Susu bubuk bebas lemak	3,8 %	1,0 %	3 %
Kakao bubuk	3,5 %	11,0 %	5 %
Lemak susu	0,5 %	99,9 %	2 %

Padatan kakao tanpa lemak total (% b/b, bk)

$$= \frac{((19 - (53 \times 19) - (3 \times 19)) + (5 - (11 \times 5) - (3,5 \times 5)))}{(40 - (0,2 \times 40)) + (21 - (0,1 \times 21)) + (19 - (3 \times 19)) + (10 - (4 \times 10)) + (3 - (3,8 \times 3)) + (5 - (3,5 \times 5)) + (2 - (0,5 \times 2))} \times 100\%$$

$$= \frac{12,635}{98,63} \times 100\%$$

$$= 12,811 \%$$

A.7.4 Padatan susu total (*total milk solids*)

A.7.4.1 Prinsip

Padatan susu dalam cokelat adalah bahan-bahan susu (*milk ingredients*) yang digunakan di dalam pembuatan cokelat; dalam hal ini mengacu pada susu dengan komposisi naturalnya, kecuali bahwa lemak susu boleh ditambahkan atau dihilangkan. Dengan demikian, bahan-bahan susu ini dapat berupa susu bubuk berlemak (*full cream milk powder*), susu bubuk tanpa lemak (*skim milk powder*), susu bubuk lemak tinggi (*high fat milk powder*), atau lemak susu (*milk fat*).

A.7.4.2 Perhitungan

Padatan susu (% b/b, bk)

$$= \frac{((MP1-(ka_{MP1} \times MP1)) + (MP2-(ka_{MP2} \times MP2)) + \dots + (MF-(ka_{MF} \times MF)))}{(S-(ka_S \times S)) + (CB-(ka_{CB} \times CB)) + (CM-(ka_{CM} \times CM)) + (MP-(ka_{MP} \times MP)) + (CP-(ka_{CP} \times CP)) + (MF-(ka_{MF} \times MF))} \times 100\%$$

Keterangan:

- MP adalah kadar susu bubuk dalam formula cokelat (%), dapat lebih dari 1 tipe
 ka_{MP} adalah kadar air dari susu bubuk yang digunakan (%), disesuaikan dengan tipenya
 MF adalah kadar lemak susu yang digunakan (ditambahkan) dalam formula cokelat (%)
 ka_{MF} adalah kadar air dari lemak susu digunakan (ditambahkan) (%)
 CM adalah kadar kakao massa dalam formula cokelat (%)
 ka_{CM} adalah kadar air dari kakao massa yang digunakan (%)
 CP adalah kadar kakao bubuk dalam formula cokelat (%)
 ka_{CP} adalah kadar air dari kakao bubuk yang digunakan (%)
 S adalah kadar gula dalam formula cokelat (%)
 ka_S adalah kadar air dari gula yang digunakan (%)
 CB adalah kadar lemak kakao dalam formula cokelat (%)
 ka_{CB} adalah kadar air dari lemak kakao yang digunakan (%)

Contoh :

Material	Contohkadar air	Contohkadarlemak	Contoh formula
Gula	0,2 %	0 %	40 %
Lemak kakao	0,1 %	99,9 %	21 %
Kakao massa	3,0 %	53,0 %	19 %
Susu bubuk berlemak	4,0 %	26,0 %	10 %
Susu bubuk bebas lemak	3,8 %	1,0 %	3 %
Kakaobubuk	3,5 %	11,0 %	5 %
Lemaksusu	0,5 %	99,9 %	2 %

Padatan susu (% b/b, bk) =

$$= \frac{((10-(4 \times 10)) + (3-(3,8 \times 3)) + (2-(0,5 \times 2)))}{(40-(0,2 \times 40)) + (21-(0,1 \times 21)) + (19-(3 \times 19)) + (10-(4 \times 10)) + (3-(3,8 \times 3)) + (5-(3,5 \times 5)) + (2-(0,5 \times 2))} \times 100\%$$

$$= \frac{14,476}{98,63} \times 100\%$$

$$= 14,677 \%$$

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 931.05, Fat Free Cocoa Solid*, 18th Edition, Chapter 31.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 963.15, Fat in Cacao Products*, 18th Edition, Chapter 31.4.02.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- ISO 6579:2002. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella sp.*
- ISO 4833:2003. *Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Tehnique at 30 °C.*
- SNI 7387 : 2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*
- SNI 7388 : 2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*